

論文内容の要旨	
論文提出者氏名	前田 裕史
論文題目	Establishment of isogenic iPSCs from an individual with <i>SCN1A</i> mutation mosaicism as a model for investigating neurocognitive impairment in Dravet syndrome.
論文内容の要旨	

Dravet 症候群（以下 DS）は乳児期発症の難治性てんかんと様々な行動異常、認知障害を合併する疾患である。DS の大半は電位依存性 Na チャネル (Nav1.1) の  $\alpha$  サブユニットをコードする *SCN1A* の変異により発症する事が知られている。また、DS のモデルマウスでもヒトと同様に自閉症様行動を引き起こすことが報告されているが、その認知障害の発症メカニズムについてはよくわかっておらず、有効な治療法もまだない。そこで、我々はヒトの DS における認知障害の発症メカニズムについて解析を行った。

我々は DS の認知障害に関わる因子として、神経伝達物質の一つであるドーパミンに着目した。ドーパミンは、以前より自閉症や統合失調症などの精神疾患との関与が言われている。また近年の網羅的遺伝子解析でも、自閉症の原因遺伝子としてドーパミンに関連する遺伝子の変異が報告されている。D2 受容体拮抗薬のリスペリドンが自閉症児の行動異常に著効することからもドーパミンと自閉症などの認知障害は密接に関与していると考えられ、DS におけるドーパミンの変化を検討する事とした。しかし、解析のために用いるヒトの神経細胞を非侵襲的に手に入れることは非常に困難である。そこで、我々は induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を神経細胞に分化誘導する技術を用いて DS の病態解析を行う事とした。DS では *SCN1A* 以外の修飾遺伝子が表現型に影響する事が知られている。また、認知障害に関わる変化は in vitro では特に微細であるため、*SCN1A* 以外の遺伝的背景による影響を除去したモデルが必要である。そこで、正常と変異 (ナンセンス変異) の *SCN1A* を末梢血にモザイクで有する一個人のリンパ球から正常 *SCN1A* を持つ iPS 細胞 (wild-type) と変異 *SCN1A* を持つ iPS 細胞 (mutant) を樹立した。このモデルの特徴は、同一個人から正常コントロール、疾患クローンの iPS 細胞を樹立するため、理論上は *SCN1A* 以外が isogenic な遺伝的背景を有した両者での比較検討が可能な点である。

まず、iPS 細胞としての未分化能、多分化能を有する事を奇形種作成、定量 PCR 法で確認した。また、定量 PCR 法で *SCN1A* の mRNA 発現が mutant で wild-type の半量である事を確認し、正常コントロール、疾患クローンの iPS 細胞としての性質をそれぞれ有している事を確認した。次に、それぞれの iPS 細胞を Serum-Free Embryonic Body quick (SFEBq) 法によって神経細胞へ分化誘導を行った。この神経細胞が主に前脳、中脳、間脳系へ分化誘導されている事を RT-PCR 法により確認した。また、免疫染色、定量 PCR 法、タンパク定量解析を用いて、wild-type, mutant が同等に神経分化されている事を確認した。次に、ドーパミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現解析を行ったところ、wild-type と比較して mutant では mRNA、タンパクレベルでの有意な上昇を認めた。また、培養液中のドーパミン濃度を ELISA 法により解析したところ、mutant では wild-type より有意な上昇を認めた。そこで、免疫染色でドーパミンニューロンの成熟ニューロンにおける割合 (TH 陽性かつ TUJ1 陽性細胞/TUJ1 陽性細胞) を評価したところ、両者に有意な差は認めなかった。以上より、mutant 由来の神経細胞ではドーパミンニューロンの機能変化によるドーパミン過剰を認めたと考えられた。そこで、*SCN1A* 変異がドーパミン分泌に影響

するメカニズムとして、TH の調節因子である c-AMP response element binding protein (CREB) のリン酸化についても検討したが、mutant 由来の神経細胞で上昇を認めていなかったため、TH 上昇のメカニズムは主に別の経路が関与していると考えられた。

我々は正常と変異の *SCN1A* をモザイクで有する一個人の血球から正常コントロール、疾患クローンの iPS 細胞をそれぞれ樹立した。このモデルを用いて、*SCN1A* 変異がドーパミンニューロンの機能異常を引き起こす事を示した。以上の結果から、DS における認知障害の発症メカニズムとして、ドーパミン系の異常が関与している可能性が示唆された。しかし、変異 *SCN1A* がドーパミン異常を引き起こすメカニズムについては不明であり、今後の更なる検討が必要である。本研究からドーパミンが DS の行動異常、認知障害における診断マーカーや治療標的になる可能性が示唆された。